

АКТИВАЦИЯ МАКРОФАГОВ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ СТРЕСС-АДАПТАЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ ОРГАНИЗМА НА ОБЛУЧЕНИЕ

Д.Р. Петренёв, А.Д. Наумов
Гомель, ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»

Интерес к проблеме эффектов *малых доз* ионизирующих излучений значительно вырос в последние годы в связи с необходимостью объяснения механизмов *опосредованных* или *немишеных* (с англ. «*untargeted*») последствий облучения, а также отдалённых радиационных эффектов [1]. В последних исследованиях подтверждена их связь с увеличением рисков возникновения онкологических и неонкологических заболеваний [2]. Однако, механизмы развития этих эффектов далеки от полного понимания.

Воздействие ионизирующих излучений на живой организм значительно отличается от эффектов *in vitro* и сопровождается развитием таких феноменов как *адаптивный ответ*, *эффект свидетеля*, *нестабильность генома*, которые, по сути, являются проявлением системной стресс-адаптационной реакции организма на воздействие повреждающего фактора. В основе развития этих, зачастую неспецифических, эффектов лежат сигнальные каскады, запускаемые первичными повреждениями и ионизационными событиями [3]. При этом носителями сигнала могут выступать маркеры повреждения клеток, протеолитические ферменты, продукты окислительного стресса, про-воспалительные цитокины и хемокины, а также активные формы кислорода и азота (АФА). Так, последние исследования в этой области подтвердили, что вероятность возникновения лейкозов у облученных мышей в отдалённый пострadiационный период [4] и частота мутантных форм лимфоцитов у работников атомной промышленности [5] зависит от уровня продукции АФА макрофагами костного мозга и лейкоцитами соответственно.

В связи с указанными выше предпосылками и полученными ранее результатами, представляется важным изучение показателей окислительного метаболизма фагоцитов и роли этих клеток в развитии окислительного стресса. Цель данного исследования - охарактеризовать продукцию АФА резидентными макрофагами перитонеальной полости и костного мозга в отдалённый период после воздействия ионизирующего излучения, а также оценить связь с состоянием антиокислительных систем сыворотки крови.

Материалы и методы. Исследование выполнено на самцах крыс *Wistar* в возрасте 6 месяцев на момент начала эксперимента. Животных подвергали внешнему воздействию *гамма-излучения в дозе 1 Гр* (0,93Гр/мин, ¹³⁷Cs), из эксперимента выводили на 78 сутки после облучения. Контролем служили интактные животные того же возраста и пола, содержавшиеся в аналогичных условиях и получавшие идентичное питание.

Резидентные перитонеальные макрофаги и клетки костного мозга из бедренной кости выделяли при помощи лаважа, использовали раствор Хэнкса (pH=7,4) без фенолового красного (0,5% Antibiotic/antimicotic cocktail, Sigma; 10 mM HEPES, Promega; гепарин 2,5 ед./мл).

Уровень базальной и стимулированной эндотоксином (250 нг/мл, *E.coli* серотип 055:B5, Fluka) *продукции активных форм азота* определяли по уровню накопления нитрита в суточных культурах (37°C, 5% CO₂) в реакции с модифицированным реактивом Грисса [6]. *Общую антиоксидительную активность* сыворотки крови определяли по методу [7] с реактивом 2,2'-азо-бис-(2-амидинопропан) дигидрохлорид (AAPH, Aldrich). Записывали динамику люминесценции в течение 1 ч., оценивали время задержки и интегральную интенсивность свечения 0-40 мин. Для построения калибровочной кривой в качестве стандарта использовали водорастворимый аналог витамина Е (TROLOX, Sigma).

Измерения проводили на оборудовании Safire² и INFINITE M200 (TECAN, Австрия). Для получения, обработки и статистического анализа данных применяли пакеты программ TECAN MagellanTM, Microsoft Excel и Graph Pad Prism. Достоверность отличий от контроля определяли с использованием критерия Mann-Whitney (U-test).

Результаты и их обсуждение. Ранее нами было установлено [8], что восстановление организма в отдалённый период после воздействия ионизирующего излучения в дозе 1 Гр сопровождается инфильтрацией лейкоцитов в перитонеальную полость у облученных животных и увеличением базального уровня продукции активных форм кислорода и азота перитонеальными макрофагами. Важным представляется тот факт, что динамика этих показателей совпадала с уровнем продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови, приведённой на рисунке 1. В первые две недели события развиваются по стандартному сценарию ответа организма на токсический фактор, однако далее фаза компенсации сменяется истощением адаптационных резервов и развитием «вторичного окислительного стресса» [8]. В связи с этим, наиболее интересным, в ключе изучения отдалённых последствий облучения в дозе 1 Гр, являются 2^{ой} и 3^{ий} месяцы после воздействия.

Как видно из данных представленных на рисунке 2, усиление базальной продукции АФА в отдалённый пострadiационный период (78 сутки) характерно не только для периферических макрофагов в перитонеальной полости (см. Рис 2а), но и для клеток стромы костного мозга (см. Рис 2б). Уровень общей антиоксидительной активности сыворотки крови в этот период имел выраженную тенденцию к снижению (см. Рис 2с) у облучённых животных, а интенсивность перекисных процессов была достоверно выше контрольных значений, о чём свидетельствовала повышенная интенсивность свечения образцов сыворотки в тесте с ААРН (см. Рис 2д).

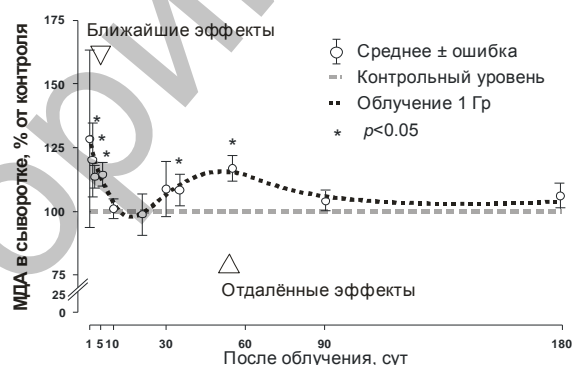


Рисунок 1 - Динамика уровня продуктов перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид) в сыворотке крови облучённых крыс

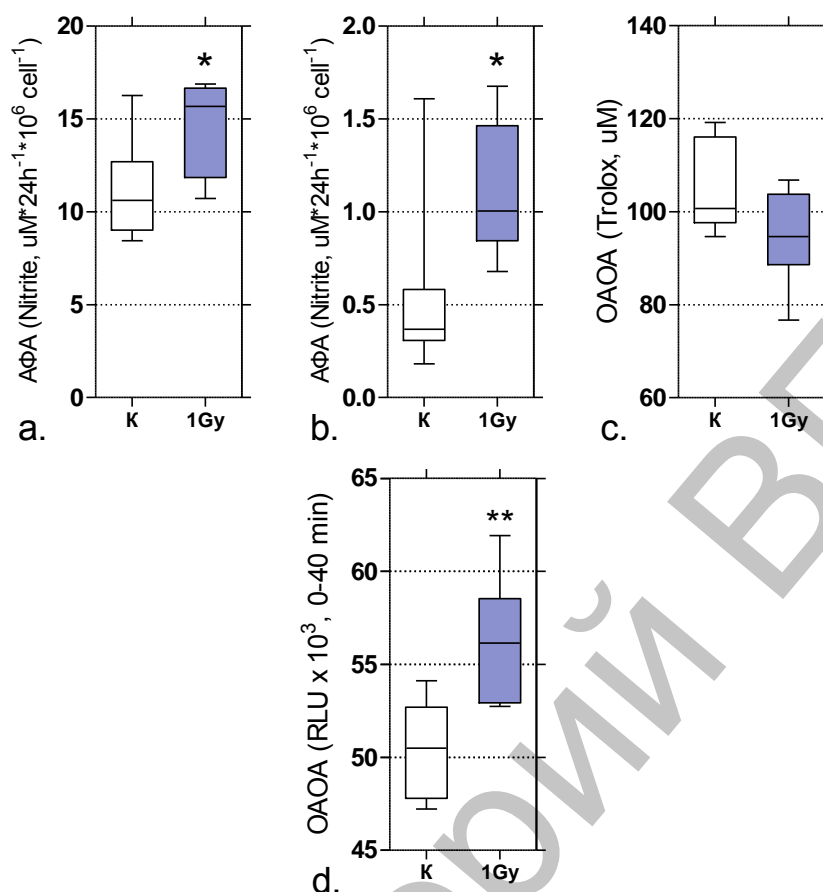


Рисунок 2 - Отдалённые эффекты (78 сутки) облучения гамма-лучами в дозе 1Гр (0,93 Гр/мин). Базальный уровень продукции активных форм азота (АФА) перитонеальными макрофагами (a) и клетками костного мозга (b). Общая антиокислительная активность (ОАОА) сыворотки крови выражена в эквивалентных единицах TROLOX (c), интенсивность вспышки (d) пропорциональна уровню промежуточных продуктов перекисного окисления липидов. Данные представлены как медиана, интерквантильный размах и min-max (N=7). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ Mann-Whitney (U-test)

Закключение. Описанные в работе отдалённые эффекты воздействия ионизирующего излучения на организм носят характер хронического воспалительного процесса. Спектр выявленных изменений свидетельствует о развитии окислительного стресса, а также о выраженном истощении антиокислительных систем, связанном с усилением базальной продукции активных форм азота макрофагами на периферии и в центральных отделах кроветворной системы. Описанные биологические эффекты являются опосредованными и могут увеличивать скорость соматического мутагенеза и повышать риск возникновения новообразований.

Список литературы

1. Wright, E.G. and P.J. Coates, *Mutat Res*, 2006. 597: p. 119-132.
2. Hildebrandt, G., *Mutat Res*, 2010. 687(1-2): p. 73-77.
3. Mikkelsen, R.B. and P. Wardman, *Oncogene*, 2003. 22(37): p. 5734-54.
4. Coates, P.J., et al., *J Pathol*, 2008. 214(5): p. 610-6.

5. Замулаева И.А., и др., Радиационная Биология. Радиоэкология, 2007. 47(1): p. 86-92.
6. Marzinzig, M., et al., Nitric Oxide, 1997. 1(2): p. 177-89.
7. Шкурупий В.А., и др., БЮЛЛ. СО РАМН, 2006. 2(120): p. 159-165.
8. Петренёв Д.Р., Господарев Д.А., Молодёжь в науке - 2007: прил. к журн. «Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі». В 4 ч. Ч. 1. Серии мед. Наук: - Минск: Белорус. Наука, 2008: p. 401-406.

СИМПАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В БРЮШНО-АОРТАЛЬНОМ СПЛЕТЕНИИ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКОРАМИИ И ДРУГИХ СТРЕССОРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ: РОЛЬ НИТРЕРГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ

С.А. Руткевич, В.Б. Казакевич

Минск, БГУ, кафедра физиологии человека и животных

В литературе накапливается материал, свидетельствующий о вовлечении монооксида азота (NO) в процессы утилизации глюкозы клетками. Есть экспериментальные подтверждения зависимости транспорта глюкозы в скелетных миоцитах от NO [4, 5]. Установлена взаимосвязь между повышением уровня глюкозы в крови и тяжелыми ранениями («стрессовая гипергликемия»), получены доказательства влияния «стрессовой гипергликемии» на увеличение зоны ишемического повреждения головного мозга [5]. Эти данные позволяют предположить, что вклад NO-ергических нейрорхимических механизмов в процессы, связанные с гипергликемией, может быть одним из ключевых.

Целью исследования явился электрофизиологический и фармакологический анализ участия монооксида азота в осуществлении симпатических реакций, вызываемых введением глюкозы в ликвороносное пространство спинного мозга и другими чрезвычайными раздражителями интеро- и экстероцепторов.

Материал и методы исследования. Эксперименты выполнены на 27 наркотизированных (30 мг/кг нембутала и 500 мг/кг уретана или 1 г/кг уретана внутривентриально) крысах (260-320 г) с применением принципов гуманного отношения к лабораторным животным. Регистрировали симпатическую импульсацию в ветвях брюшно-аортального сплетения (до и после введения глюкозы и NO-активных препаратов), Н-рефлекс в мышцах подошвенной поверхности стопы в ответ на раздражение медиального подошвенного нерва (до и в процессе стимуляции висцеральных и соматических афферентов). Стимулировали (5 В; 1 мс; 10 Гц) проксимальные фрагменты брыжеечного и большеберцового нерва. Электрокардиограмму регистрировали во втором стандартном отведении. Раствор глюкозы (0,02 мл 40% раствора) и фармакологические препараты вводили интратекально [1]. Использовались неселективный ингибитор NO-синтазы метиловый эфир N-нитро-L-аргинина (L-NAME «Sigma», 60 мкг/0,02 мл), биологический субстрат NO-синтазы L-аргинин (80 мкг/0,02 мл), а также химический донор NO нитропруссид натрия (0,26 мкг/0,01 мл). Регистрация и обработка электрических сигналов выполнялась на